

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-133763

(43)Date of publication of application : 17.05.1994

(51)Int.Cl. C12N 1/20
A01N 63/00
A01N 63/02
// (C12N 1/20
C12R 1:125)

(21)Application number : 04-287884 (71)Applicant : SHOWA DENKO KK

(22)Date of filing : 26.10.1992 (72)Inventor : SHODA MAKOTO
SATO HAJIME

(54) NOVEL MICROORGANISM AND BLIGHT CONTROL AGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To separate various microorganisms for a compost and subsequently to obtain a microorganism effective for controlling blights.

CONSTITUTION: A novel microorganisms, Bacillus subtilis SD 142 strain, and a blight control agent containing the cultured product and/or cells of the microorganism as an active ingredient. The strain, Bacillus subtilis SD 142 exhibits an extremely excellent control effect on blights including those of soil source.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 26.04.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3132195

[Date of registration] 24.11.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-133763

(43)公開日 平成6年(1994)5月17日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/20	A	7236-4B		
A 0 1 N 63/00	F	9159-4H		
63/02	E	9159-4H		
// (C 1 2 N 1/20				
C 1 2 R 1:125)				

審査請求 未請求 請求項の数 2(全 6 頁)

(21)出願番号 特願平4-287884

(22)出願日 平成4年(1992)10月26日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年10月10日
社団法人日本生物工学会発行の「平成4年度日本生物工
学会大会講演要旨集」に発表

(71)出願人 000002004

昭和電工株式会社

東京都港区芝大門1丁目13番9号

(72)発明者 正田 誠

神奈川県横浜市緑区市ケ尾町1062-1-
406

(72)発明者 佐藤 元

東京都大田区多摩川2丁目24番25号 昭和
電工株式会社生化学研究所内

(74)代理人 弁理士 寺田 賢

(54)【発明の名称】 新規微生物および植物病害防除剤

(57)【要約】

【目的】 堆肥中から各種の微生物を分離し、植物病害
の防除に有効な微生物を得る。

【構成】 新規な微生物バチルス・ズブチリスSD14
2株並びに、その微生物の培養物および／または菌体を
有効成分として含有することを特徴とする植物病害防除
剤。

【効果】 バチルス・ズブチリスSD142株は土壌病
害を含む植物病害に対して極めて優れた防除効果を示
す。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 バチルス・ズブチリスに属する新規な微生物、バチルス・ズブチリスSD142株(Bacillus subtilis SD142) (微工研菌寄第13204号)。

【請求項2】 バチルス・ズブチリスSD142株の培養物および／または微生物菌体を有効成分として含有することを特徴とする植物病害防除剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はバチルス・ズブチリスに属する新規微生物、及びこの微生物に由来する植物病害防除剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 農園芸作物の病害は多くの場合、作物が栽培される土壤中に存在する糸状菌や細菌によって引き起こされることが知られている。従来、このような病原性糸状菌や病原性細菌により引き起こされる植物の病害を防除する手段として、クロロピクリン剤や臭化メチル剤等の土壤殺菌剤を用いて土壤を蒸気消毒する化学的方法、非宿主作物との輪作等の生態学的方法、病害抵抗性品種・台木を利用する育種学的方法等が一般的に行われている。

【0003】 しかし、土壤蒸気消毒等の化学的方法は土壤殺菌剤の毒性が極めて高く作業者及び周辺住民の健康を害する危険性があり、更に化学的に消毒された土壤では正常な微生物相も破壊されているため、新たな病原菌の侵入により大きな被害が引き起こされる危険性がある。

【0004】 輪作は実験的には有効な防除方法であるが、現在の集約的な農業生産体制のもとでは経済的に見合う輪作物選定の困難さにより有効な輪作体制をとれないのが実状であり、又、宿主範囲の広い病害に対しては有効な防除方法にはならない。抵抗性品種・抵抗性台木の育成は多大な労力と長い年月が必要である上に、特定の病害防除にのみ有効であり、地域外から侵入する新たな病原菌に対する抵抗性が保証されない欠点を有している。

【0005】 以上の理由により、これらの手段に代わる有効な防除方法が求められており、安全性が高く、環境を汚染しない防除法として、自然に存在する特定の拮抗微生物を利用した生物防除法が研究されている。すなわち、病原菌に対する拮抗作用を有する微生物を植物体や土壤に適用することにより、病原菌の生育や植物体への感染を抑制する生物防除の方法が開発されている。例えば、シュードモナス属の微生物を利用した防除法として特開昭60-186230、特開昭61-195686、特開昭62-123104、特開昭62-148413、特開昭63-22005、特開昭64-16579、特開平2-35075、特開平2-35076、特開平2-46283、特開平2-59504、特開平2

-149507、特開平2-211861等が開示されている。又、バチルス属の微生物を利用した防除法として特開昭63-273470、特開平2-48509、特開平2-209803、特開平3-128988、特開平4-117278等が、フザリウム属の微生物を利用した防除法として特開昭64-90107、特開平1-165506等が開示されている。しかしながら、植物病害の防除において、効力的に有効なものは極めて少ない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは、かかる現状において、前記防除手段に代わるべき方法として、堆肥中から各種の微生物を分離し、植物病害の防除に有効な微生物を鋭意探索した結果、バチルス・ズブチリスに属し、イツリン(iturin)とサーファクチン(surfactin)を生産する特定の菌株が各種の植物病害の防除に非常に大きな効果を示すことを見だし、これにより植物病害防除剤を完成するに至った。

【0007】 イツリンはバチルス属に属するある種の菌株が生産し、植物病原菌に対して抗菌作用を有する成分として、既に報告されている(Tetrahedron Letters 23, No.30, 3065~3068, 1982)。一方、サーファクチンはバチルス属のある種の菌株が生産する界面活性物質である(BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 31, 488~494, 1968)が、植物病原菌に対する抗菌作用は現在までのところ何ら知られていない。本発明者らはイツリンとサーファクチンの植物病原菌生育抑制作用を研究する過程で、サーファクチンがそれ単独では植物病原菌に対する抗菌作用を示さないが、イツリンと共に作用させることによりイツリンの植物病原菌に対する抗菌作用を飛躍的に増強することを見だした。これらの抗菌物質により植物病害を防除しようとする際に、抗菌物質を微生物から単離することなく、抗菌物質を生産する微生物を直接植物に適用できれば極めて好都合であり、本発明者はかかる理由から、更に研究を進め、イツリンとサーファクチンを生産する微生物による植物病害防除剤を見出した。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明はバチルス・ズブチリスSD142株および、その培養物および／または微生物菌体を有効成分として含有することを特徴とする植物病害防除剤に関する。

【0009】 以下本発明について詳細に説明する。本発明に用いられるバチルス・ズブチリスSD142株は堆肥から分離されたものである。本菌株は以下に示す菌学的性質を有する。

【0010】 細菌学的性質

(a) 形態

(1) 細菌の形：桿状

(2) 細菌の大きさ：0.7~0.9×1.5~3.0μ

m

(3) 多形性：なし

(4) 運動性：あり

(5) 胞子の有無：あり

胞子の形：楕円形あるいは円筒状

(6) グラム染色性：陽性

(7) 抗酸性：陰性

(b) 生育状況

肉汁寒天平板培養：コロニーは円形で大きさは直径1～2mm、周縁形は波状、粘性あり、光沢無し。

(c) 生理学的性質

(1) 硝酸塩の還元：陽性

(2) VPテスト：陽性

(3) インドールの生成：陰性

(4) クエン酸の利用：陽性

(5) コハク酸の利用：陰性

(6) プロピオン酸の利用：陰性

(7) 酒石酸の利用：陰性

(8) ウレアーゼ：陰性

(9) オキシダーゼ：陽性

(10) カタラーゼ：陽性

(11) 生育の範囲：pH5～9

温度20～50℃

(12) 10%NaCl培地：生育

(13) 嫌気培養：陰性

(14) 卵黄反応：陰性

(15) デンプンの加水分解：陽性

(16) アルギニンの分解：陽性

(17) チロシンの分解：陰性

(18) ゼラチンの液化：陽性

(19) エスクリンの分解：陽性

(20) OFテスト：酸化的

(21) グルコースからの酸生成：陰性

【0011】以上の特徴をバージェイズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー(Bergeys Manual of Systematic Bacteriology)を参照して同定を行った結果、本菌株をバチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)の一菌株と同定し、バチルス・ズブチリスSD142株(以下、SD142と略す。)と命名した。なお本菌株を工業技術院微生物工業技術研究所に、微生物寄託番号「微工研菌寄第13204号」として寄託した。

【0012】SD142がイツリンとサーファクチンを生産することは、SD142の培養液から菌体を除いた上清をpH2に調整して沈澱する成分をメタノールで抽出し、更にTLCによって分離した各成分のマススペクトル、赤外吸収スペクトル、アミノ酸分析によって確認できる。

【0013】本発明において使用することのできる培地としては、本菌株が培養により増殖し得るものであれば

任意のものでよい。例えば、培地に用いる炭素源としては、グルコース、サッカロース、デンプン、デンプン糖化液、糖蜜等の糖類、クエン酸等の有機酸、グリセリン等のアルコールなど、窒素源としては、アンモニア、硫酸安、燐安、塩安、硝安等のアンモニウム塩や硝酸塩が適宜使用される。無機塩としては、リン酸、カリウム、マグネシウム、マンガン等の塩類、例えばリン酸二水素カリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸第一鉄などがあげられる。また微量有機栄養素としてビタミン、アミノ酸、核酸関連物質等は菌の生育上特に必要ではないが、これらを添加したり、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、大豆粕等の有機物を添加してもよい。さらに、必要に応じて消泡剤等の種々の添加剤を添加することもできる。

【0014】本発明方法における培養は好気的条件下に、例えば通気攪拌や振盪培養法あるいは固体培養法等によって培養することができる。培養条件は特に限定はないが、温度は25～45℃、pHは5.0～8.0、培養時間は15～60時間の範囲が適当である。

【0015】以上のように培養したSD142は培養物から分離することなく利用することができ、また通常の方法、例えば膜分離あるいは遠心分離等の処理によって菌体を分離して利用することもできる。更には、培養物あるいは分離した菌体を凍結乾燥、スプレードライ等の方法によって乾燥した乾燥菌体を利用することもできるし、又、農薬製剤の慣用的な方法に従って各種の添加物と共に製剤化したものをを用いることもできる。例えば粒剤、乳剤、水和剤、フロアブル剤等が挙げられる。

【0016】このように調製したSD142の培養物あるいは分離した菌体を、植物体あるいは土壤に適用することにより農園芸作物の各種の病害を防除することができる。本発明防除剤は、アルターナリア(*Alternaria*)、セロスボラ(*Cerospora*)、フィトフトラ(*Phytophthora*)、ボトリチス(*Botrytis*)、リゾクトニア(*Rhizoctonia*)、ピリキュラリア(*Pyricularia*)、コクリオボルス(*Cochliobolus*)、フザリウム(*Fusarium*)、ビシウム(*Phthium*)、バーティシリウム(*Verticillium*)、ジベレラ(*Gibberella*)、キサントモナス(*Xanthomonas*)、シュードモナス(*Pseudomonas*)、アグロバクテリウム(*Agrobacterium*)、エルウィニア(*Erwinia*)等の病原菌により引き起こされる病害の防除に顕著な効果を示す。特に、土壤病害菌である青枯病菌、苗立枯病菌、軟腐病菌、疫病菌、ムギ立枯病菌、各種フザリウム病菌、かいよう病菌、根腐病、紋枯病菌、十字科、アブラナ科根こぶ病菌、紋羽病菌、白絹病菌、芝ラージバッチ等に対して有効である。本発明防除剤の施用法は、前述の使用形態(製剤等)、作物や病害等によって適宜選択されるが、例えば地上液剤散布、地上固形剤散布、空中液剤散布、空中固形剤散布、水面施用、施設内施用、土壌施用、表面処理(種子消毒等)や育苗箱施用法などがある。

【0017】施用量は病害の種類、適用作物、剤型等によって異なるため、一概には規定できないが、例えば、菌体を土壌に混和する場合には混和量は土壌1g当りの菌数が $10^5 \sim 10^8$ 個程度が適当であり、混和時期は播種あるいは苗定植前が望ましい。

【0017】

【実施例】以下に実施例により本発明を更に詳細に説明する。

実施例1

グルコース2%、ポリペプトン1%、リン酸一カリ0.1%、硫酸マグネシウム0.05%を含む培地100m³ ※1を500ml容の坂口フラスコに入れ、SD142を1白金耳植菌して、35℃、120rpmの条件にて24時間振盪培養して培養液を得た。この培養液を浸み込ませた直径8mmのペーパーディスクを、各種の植物病原菌を混合したしょ糖-ポテト寒天平板培地の上に置いて、25℃で培養した。1週間後にペーパーディスクの周辺に形成される阻止円の大きさを調べた。結果は表1に示すとおり、SD142は非常に多くの種類の植物病原菌に対して、その増殖を抑制した。

※1を500ml容の坂口フラスコに入れ、SD142を1白金耳植菌して、35℃、120rpmの条件にて24時間振盪培養して培養液を得た。この培養液を浸み込ませた直径8mmのペーパーディスクを、各種の植物病原菌を混合したしょ糖-ポテト寒天平板培地の上に置いて、25℃で培養した。1週間後にペーパーディスクの周辺に形成される阻止円の大きさを調べた。結果は表1に示すとおり、SD142は非常に多くの種類の植物病原菌に対して、その増殖を抑制した。

【0018】

【表1】

供試植物病原菌	阻止円の大きさ
Rhizoctonia solani	+++
Cochliobolus miyabeanus	+++
Alternaria mali	++
Pyricularia oryzae	+++
Fusarium oxysporum	++
Verticillium dahliae	++
Cercospora kikuchii	++
Phytophthora infestans	+++
Gibberella zeae	++
Phthium ulitimum	++
Botrytis cinerea	+++
Erwinia carotovora	+
Agrobacterium tumefaciens	+
Pseudomonas syringae	++
Xanthomonas oryzae	+++

—：阻止円非形成
+：直径2cm未満
++：直径2～4cm
+++：直径4cm以上

【0019】実施例2

（菌体製造例）下記組成を有し、pHを7に調整して高圧加熱滅菌した培地100mlを500ml容の坂口フラスコに入れ、SD142を1白金耳植菌して、35℃、120rpmの条件にて10時間前培養した。同組成の培地15Lを30L容の発酵槽に入れ、前培養菌液100mlを植菌して、好気的条件下で35℃で30時間培養して培養液を得た。更に、得られた培養液を3,000rpmで10分間遠心分離して生菌体を得た。

【0020】

培地成分 添加量 (g/l)

グルコース	10
ポリペプトン	30
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5

※【0021】実施例3

（トマト苗立枯病の防除例）パーミキュライト・フスマ培地で2週間培養したトマト苗立枯菌リゾクトニア・ソラニ（Rhizoctonia solani）を、高圧加熱滅菌した培地に5%の割合で混合して汚染土を作成した。直径9cmのポットに汚染土を約250g詰め、実施例2によって得たSD142の培養液あるいは分離した生菌体を土壌1g当りの菌数が約 10^7 個になるように汚染土壌に混合した。トマト（品種：桃太郎）種子を各ポット当り15粒ずつ蒔いて、25℃の恒温槽内で栽培した。草丈15cmあるいは本葉5以上の時点で発病状況を調査した。各処理区2反復で試験して、枯死したものを3、萎ちょうしているものを2、病斑が認められたものを1、健全なものを0として発病指数を求め、以下の式により発病率および防除率を算出した。

【0022】

【数1】

$$\text{発病率 (\%)} = \frac{\sum (\text{サンプル数} \times \text{発病指数})}{\text{全サンプル数} \times 3} \times 100$$

【数2】

$$\text{防除率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{試験区の発病率}}{\text{対照区の発病率}} \right) \times 100$$

【0023】結果は表2に示すとおり、本発明に係わる微生物を土壌に処理することにより、トマト苗立枯病の発病率が無処理区と比べて著しく減少し、極めて高い防* 除効果が得られた。

【0024】

【表2】

処理	発病率 (%)	防除率 (%)
無処理	75.6	—
培養液	11.1	85
菌体	10.0	87

【0025】実施例4

(キュウリつる割病の防除例) キュウリつる割病菌フザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cumerinum*) をフスマ培地で3週間培養した後、高圧加熱滅菌した培土に1%の割合で混合して汚染土壌を作成した。直径15cmのポットに汚染土壌を約600g詰め、実施例2によって得たSD142の生菌体を凍結乾燥した乾燥菌体を土壌1g当りの生菌数が約 10^8 個になるように試験区の汚染土に混合した。各ポットにキュウリ種子を20粒づつ蒔き、滅菌培土100mlを覆土し※

10※た。温室内で約3週間栽培後、発病状況を調査した。各処理区3反復で試験して、しおれた株数の全株数に対する割合を発病株率として、それから防除率を算出した。結果は表3に示すとおり、本発明に係わる微生物を土壌に処理することにより、キュウリつる割病の発病率が無処理区と比べて著しく減少し、極めて高い防除効果が得られた。

【0026】

【表3】

処理	発病株率 (%)	防除率 (%)
無処理	65.2	—
乾燥菌体	11.7	82

【0027】実施例5

(メロン根腐れ病の防除例) 直径9cmのポットにメロン根腐れ病菌で汚染された土壌約250gを詰め、実施例2によって得たSD142の培養液あるいは分離した生菌体を土壌1g当りの菌数が約 10^7 個になるように混合した。予め栽培したメロン(品種:メロディー2号) 30苗を各ポット当たり1株づつ定植して、温室内で1ヶ月間★

★栽培した。各処理区9反復で試験して、実施例3と同様にして発病率および防除率を算出した。結果は表4に示すとおり、本発明に係わる微生物を土壌に処理することにより、メロン根腐れ病の発病率が無処理区と比べて著しく減少し、極めて高い防除効果が得られた。

【0028】

【表4】

処理	発病率 (%)	防除率 (%)
無処理	88.9	—
培養液	11.1	88
菌体	14.8	83

【0029】参考例

イツリンおよびサーファクチンの併用効果を調べた。所定濃度のイツリンおよびサーファクチンを含むしょ糖-ポテト平板培地上シャーレの中央に、予め培養した植物病原菌を植菌して、25℃で培養した。イツリンおよびサーファクチンを含まない培地上での植物病原菌の増殖

面積を100として、試験培地上で病原菌が増殖した面積割合(%)を測定し、病原菌の菌糸生育阻止率を算出した。結果は表5に示すとおり、サーファクチンの共存によりイツリンの抗菌作用が著しく増強された。

【0030】

【表5】

	9				10	
イツリン濃度(ppm)	5	5	5	5	30	0
サーファクチン濃度(ppm)	0	2	5	10	0	100
供試菌菌糸生育阻止率(%)						
Alternaria mali	+	+++	++++	++++	++	-
Fusarium oxysporum	+	++	+++	++++	++	-
Rhizoctonia solani	++	+++	+++	++++	+++	-
Botrytis cinerea	+	++	++++	++++	++	-
Pyricularia oryzae	++	+++	++++	++++	++	-
Cochrioborus miyabeanu	++	+++	+++	++++	++	-

- : 生育抑制無し
 + : 阻止率30%以下
 ++ : 阻止率30~60%
 +++ : 阻止率60~90%
 ++++ : 阻止率90%以上

【0031】

【発明の効果】以上述べたように、本発明の新規な微生*

* 物は植物病害防除に対して、特に土壌病害に由来する植物病害防除に対して極めて優れた効果を示す。

【手続補正書】

【提出日】平成5年3月30日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の名称

【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の名称】

新規微生物および植物病害防

除剤